



## Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士（医学）
報告番号	甲第1804号
学位記番号	第1282号
氏名	鈴木 健人
授与年月日	令和3年3月24日
学位論文の題名	Vascular Shutdown by Photodynamic Therapy Using Talaporfin Sodium (タラポルフィンナトリウムを用いた光線力学療法における血管阻害)  Cancers. 2020 Aug 21;12(9):2369
論文審査担当者	主査： 瀧口 修司 副査： 森田 明理, 高橋 智

## 【目的】

PDT (Photodynamic therapy) は、腫瘍選択的に集積する光感受性物質の静脈内投与と特定波長のレーザー照射を組み合わせた抗癌治療であり、低侵襲治療のため高齢化社会を迎えるわが国では今後の発展が期待されている。皮膚光過敏反応、長期の遮光期間、機器の費用などの欠点を克服した、第二世代の光感受性物質である Talaporfin に半導体レーザーを組み合わせた新規 PDT は化学放射線療法又は放射線療法後の局所遺残再発食道癌に対して、医師主導治験を経て 2015 年 10 月にわが国で保険承認された。PDT の抗腫瘍効果は、活性酸素である一重項酸素による直接的な殺細胞効果、免疫原性細胞死の誘導による二次的な効果に加え、腫瘍周囲の微小血管閉塞による効果 (vascular shut down effect) があり、その効果は光感受性物質に依存するといわれている。Talaporfin PDT は特に vascular shut down effect が強いといわれているがそのメカニズムは明らかになっていない。今回我々は Talaporfin PDT の vascular shut down effect に関して基礎的検討を行った。

## 【方法】

In vitro; ヒト臍帯静脈内皮細胞株 (HUVEC) を用いて検討した。

1. Talaporfin PDT を施行し、レーザーのみの群、薬剤投与のみの群と比較して殺細胞効果を検討した。
2. Tube formation assay を用いてチューブ形成の阻害効果を評価した。
3. 細胞骨格を形成する因子として、tubulin (微小管) および F-actin (actin stress fibers) の発現を蛍光免疫染色で評価した。
4. ミオシン軽鎖 (MLC) のリン酸化を western blot analysis により検討した。
5. F-actin の重合および MLC のリン酸化に関して、Rho キナーゼ阻害剤である Y-27632 投与下での変化を検討し、Rho-GTP 経路との関係を検討した。

In vivo; 異種移植皮下腫瘍マウスモデルをヒト結腸癌細胞 (HCT116) で確立し検討した。

6. レーザースペックル血流分析システム (LSBF) を用いて、Talaporfin PDT による腫瘍内血流低下を陽性対照の微小管重合阻害薬である Combretastatin A-4 phosphate (CA4P) と比較した。
7. これらの皮下腫瘍を摘出し、血管内皮細胞のマーカーである CD31 を用いて病理学的に腫瘍血管を評価した。

## 【結果】

In vitro

1. PDT 群が他の群より高い殺細胞効果を示すことを確認した。IC<sub>50</sub> は 11.66  $\mu\text{mol/L}$  であった。
2. PDT により有意差をもって薬剤濃度依存性にチューブ分枝数の減少、総本数の減少、長径の短縮を認めた。
3. PDT が微小管の破壊による tubulin の脱重合、actin stress fibers 形成による F-actin の重合を誘導することを示した。
4. PDT が MLC のリン酸化を薬剤濃度依存性に誘導することを確認した。経時的な評価では 5 分での高い誘導を認めていた。

5. Y-27632 により F-actin の重合、MLC のリン酸化が抑制されることを示し、Rho-GTP 経路との関連を確認した。

#### In vivo

6. PDT 群が腫瘍血流を低下させながらも、周囲の正常組織には影響を与えないことを確認した。  
また、レーザーのみの群、薬剤投与のみの群、CA4P 群と比較して有意に腫瘍内の血流が減少していた。
7. 病理学的に、腫瘍内血管の数は変わらなかったが血管面積、血管径が共に減少していることを示した。

#### 【考察】

今回我々は、Talaporfin PDT が直接の殺細胞効果のみならず、腫瘍血管閉塞による抗腫瘍効果を認めることを in vitro、in vivo において証明した。HUVEC を用いた in vitro の検討で、Talaporfin PDT が Rho-GTP 経路を介して MLC のリン酸化を引き起こし、血管内皮細胞の F-actin の重合による vascular shut down を導くことを解明した。これまでに、異種移植皮下腫瘍マウスモデルを用いた in vivo の検討で、血流測定によって PDT の vascular shut down effect を評価した報告はなかったが、LSBF を使用することにより鮮明な腫瘍血流の低下を測定することができた。また、vascular shut down effect は、殺細胞効果をきたす光エネルギー量よりもはるかに少ないエネルギー量で確認することができた。CD31 での免疫染色では、腫瘍血管数は変わらないが、腫瘍血管径の有意な縮小を認めた。これは Talaporfin PDT が血管新生を阻害するのではなく、血管破壊を導くことを示唆していた。

## 論文審査の結果の要旨

【背景】現在本邦では、化学放射線療法後の遺残再発食道癌に対する救済治療として第2世代の Talaporfin sodium (TS) を用いた光線力学療法(Photodynamic therapy: PDT)が2015年10月に保険収載され、その有用性が報告されている。PDTの抗腫瘍効果は、活性酸素である一重項酸素による直接的な殺細胞効果、免疫原性細胞死の誘導による二次的な効果に加え、腫瘍の微小血管閉塞による効果(vascular shut down effect)が報告されているが、その詳細なメカニズムは解明されていない。

【目的】タラポルフィンPDTのvascular shut down effectのメカニズムを解明する。

【方法・結果】1. ヒト臍帯静脈内皮細胞株(HUVEC)に対するタラポルフィンPDTのIC50は11.66  $\mu\text{mol/L}$ であった。以下の実験では血管内皮細胞死を回避するため、IC50以下の薬剤濃度で実験を行った。2. チューブフォーメーションアッセイを用いた検討では、タラポルフィンPDTは有意差をもって薬剤濃度依存性にチューブ分枝数の減少、総本数の減少、長径の短縮を誘導した。3. 蛍光免疫染色では、PDTによる微小管の破壊によるチューブリンの脱重合、アクチンストレスファイバー形成によるF-アクチンの重合が観察された。4. WBにより、PDTによるMLCのリン酸化誘導が確認された。5. ROCK阻害剤であるY27632の投与によりF-アクチンの重合、MLCのリン酸化が抑制され、Rho-GTP経路との関連が示唆された。6. 結腸癌細胞(HCT116)をヌードマウスに皮下移植した異種移植腫瘍マウスモデルでの検討では、タラポルフィンPDTは腫瘍部位での血流を低下させたが、周囲の正常組織の血流には影響を与えなかった。7. 異種移植腫瘍のCD31による免疫組織学的解析では、腫瘍内血管の数は変わらなかったが血管面積、血管径共に減少を認めた。

【考察】タラポルフィンPDTがRho-GTP経路を介してMLCのリン酸化を誘導し、血管内皮細胞のF-アクチンの重合による血管内皮細胞の構造破壊をきたすと考えられた。また、*in vivo*においても腫瘍部位の血流低下とともに、vascular shut down effectが確認された。タラポルフィンPDTは、腫瘍微小血管の血管内皮細胞の構造破壊による血管内腔狭小化、閉塞をきたし、いわゆるvascular shut down effectを導くと考えられた。

【結語】タラポルフィンPDTはRho-GTP経路を介する腫瘍微小血管の血管内皮細胞の構造破壊によりvascular shut down effectを誘導すると考えられた。

【審査内容】主査の瀧口教授からは、①今回の研究成果の今後の光線力学療法の臨床的発展への応用について、②光感受性薬剤の腫瘍血管内皮細胞への選択性について、③短時間での血管阻害を評価する実験系について、時間軸の再検討についてなど計6項目の質問があった。第一副査の森田教授からは、①ROCKの活性化の評価の必要性について、②MLCのリン酸化に関するWBでの評価の解釈について、③レーザー照射や薬剤による細胞死への影響について、など計7項目にわたり質問がなされた。第二副査の高橋教授からは、①チューブリンの脱重合とF-アクチンの重合の意義について、②PDT後24h以降での腫瘍内血流の検討について、③前立腺癌に対する新規PDTの報告について、など計7項目にわたり質問がなされた。これらの質問に対し、一部返答に窮することもあったが、おおむね満足すべき回答が得られ、学位論文の主旨を十分理解していると判断した。本研究は、これまで解明されていなかったタラポルフィンPDTによるvascular shut down effectのメカニズムの一端を初めて*in vitro*, *in vivo*の基礎的実験で解明した。よって、これらの新しい知見を報告している本論文の筆頭著者は博士(医学)の学位を授与するに相応しいと判断した。

論文審査担当者 主査 瀧口修司教授 副査 森田明理教授、高橋 智教授